

Mechanismen der molekularen Evolution

Hartmann, Thomas

Veröffentlicht in:
Abhandlungen der Braunschweigischen
Wissenschaftlichen Gesellschaft Band 63, 2010,
S.29-61



J. Cramer Verlag, Braunschweig

Mechanismen der molekularen Evolution*

THOMAS HARTMANN

Institut für Pharmazeutische Biologie, TU-Braunschweig
Mendelssohnstrasse 1, 38106 Braunschweig

1. Einleitung

Den oft zitierten Satz: „*Nothing in biology makes sense except in the light of evolution*“ verdanken wir dem bekannten russisch-amerikanischen Genetiker und Evolutionsbiologen Theodosius Dobzhansky (1900–1975). Seit es die molekulare Genetik möglich macht, den Ursprung von Genen zurückzuverfolgen und zu ergründen, wie lebende Organismen Information sammeln, auswählen und archivieren, hat der wegweisende Satz auch unter mechanistischen Biologen Anerkennung gefunden.

Die von Charles Darwin meisterhaft in Worte gefasste Evolutionstheorie vermittelte erstmals eine plausible, wissenschaftlich tragfähige Vorstellung über die Mechanismen der Entwicklung und Geschichte der Organismen. Der gewaltige Erkenntniszuwachs der Biologie in den 150 Jahren seit dem Erscheinen von Darwins Buch „*The Origin of Species*“ hat zwar dazu beigetragen, dass die ursprüngliche Evolutionstheorie in vielen Punkten verändert und erweitert wurde, die Kernaussage, die der vollständige Titel der Erstausgabe zum Ausdruck bringt (Darwin 1859), hat sich bis heute aber nicht geändert.

Evolutionsforschung beeinflusst viele biologische Disziplinen und umfasst ganz verschiedene Forschungsfelder (Tabelle 1). Die *Mikroevolution* beschäftigt sich mit allen durch natürliche Selektion hervorgerufenen Veränderungen innerhalb von Populationen bis hin zu den Mechanismen der Artenbildung. Die *Makroevolution* betrachtet größere Veränderungen zwischen Gruppen von Organismen, wie die Unterschiede in den Bauplänen von Insekten, Reptilien, Vögeln und Säugetieren, für deren Zustandekommen ganz andere Zeiträume gelten als in der Mikroevolution. Kerndisziplinen der Makroevolution sind die *Paläontologie* und, in jüngerer Zeit hinzugekommen, die molekulare Phylogenetik. Die Paläontologie ergründet und rekonstruiert historische Lebensfor-

* (Eingegangen 17.01.2011) Erweiterte Fassung des am 12.02.2010 vor der Plenarversammlung der Braunschweigischen Wissenschaftlichen Gesellschaft gehaltenen Vortrages.

men (Fossilien) und ihre Lebensräume und definiert durch geologische Datierung ihre zeitliche Einordnung. Die *Molekulare Phylogenetik* ergründet durch Sequenzvergleich homologer Nukleinsäuren und Proteine Verwandtschaft und Abstammung rezenter Lebensformen. Paläontologische und molekulare Methoden ergänzen sich in idealer Weise, wie die jüngsten Erkenntnisse über Ursprung und Entwicklung des Menschen belegen (DeSalle und Tattersall, 2008). Aus der vergleichenden Entwicklungsbiologie ist durch Verknüpfung mit der molekularen Genetik ein neues Gebiet entstanden, die *Evolutionäre Entwicklungsbiologie*, kurz *Evo Devo* (Carroll 2006). Sie stellt die molekulare Entwicklungsbiologie in den evolutionären Zusammenhang. Zu den wichtigsten Entdeckungen der *Evo Devo* gehört die Identifizierung von Mastergenen, die die Ausprägung der morphologischen Baupläne tierischer Organismen steuern und die Entwicklung ihrer Organe kontrollieren. Wegweisend war die Erkenntnis, dass homologe Mastergene in allen Tieren zu finden sind. Die verschiedenartigen morphologischen Baupläne im Tierreich sind offensichtlich durch Modifikation der Mastergene und ihres regulatorischen Umfeldes entstanden. So steuern die gleichen homologen Gene die Programme zur Entwicklung und Ausprägung der Augen in Weichtieren, Insekten und Wirbeltieren. Bisher ging man davon aus, dass sich die Augen in Insekten und Wirbeltieren unabhängig voneinander entwickelt haben. Die vielleicht wesentlichste Erkenntnis der *Evo Devo* ist, dass Evolution Neues und Neuartiges stets durch Veränderung bestehender Merkmale hervorbringt. Eine zentrale Rolle spielen dabei Veränderungen im regulatorischen Netzwerk, das bei einem Entwicklungsprozess steuert, welches Gen an welchem Ort zu welcher Zeit an- oder abgeschaltet wird. Wir werden in anderem Zusammenhang auf dieses Phänomen später zurückkommen.

Der vorliegende Beitrag betrifft das letzte, in Tabelle 1 benannte Forschungsfeld, die *Molekulare Evolution*. Die Fragestellungen der molekularen Evolution ähneln denen der *Evo Devo*, sie sind nur einfacher. Im Mittelpunkt stehen Fragen zur Evolution molekularer Merkmale und der sie kontrollierenden Gene. Zum Beispiel: Wie werden bewährte molekulare Funktionen (etwa Enzyme) und die sie kontrollierenden Gene über evolutionäre Zeiträume konserviert? Wie werden nicht mehr benötigte Funktionen eliminiert? Und als zentrale Frage, wie entstehen neue Enzyme und Gene? Die Frage nach neuen Enzymen und Genen, also neuen Funktionen, stellen sich dort, wo ein Organismus sich in seinem Lebensraum an eine sich stetig ändernde Umwelt anpassen muss. So stehen beispielsweise Pflanzen unter dem ständigen Druck hungriger Pflanzenfresser. Sie wehren sich vor allem mit chemischen Mitteln und haben im Laufe ihrer Evolution ein vielfältiges und variables Arsenal „chemischer Waffen“ entwickelt. Dieses Arsenal ist Teil des sogenannten *Sekundärstoffwechsels*, der eindrucksvolle Beispiele für die Evolution neuer Gene und Enzyme bereithält, auf die wir später zurückkommen werden. Molekulare Evolution basiert auf biologischen Gesetzmäßigkeiten und Mechanismen. Einige sind lange bekannt,

Tabelle 1. Zentrale Arbeitsfelder der Evolutionsforschung.

Mikroevolution	Evolution auf Populationsebene (Populationsgenetik), Artenbildung
Makroevolution	Evolution über der Artenebene
Paläontologie	Geologische Teilgebiet: Geologie von Fossilienlagerstätten und ihre zeitliche Datierungen. Biologische Teilgebiete: Systematisierung und Datierung von Fossilien sowie Rekonstruktion ihrer Lebensräume
Molekulare Phylogenetik	Ermittlung von Abstammung und Verwandtschaft der Arten über Sequenzvergleich homologer Proteine und DNA-Abschnitte
Evolutionäre Entwicklungsbiologie	„ <i>Evolutionary Developmental Biologie (Evo Devo)</i> “. Evolution von Entwicklungsprozessen (Ontogenesen) und deren Steuerung
Molekulare Evolution	Evolution von Proteinen und die sie codierenden und regulierenden Gene

andere erst in jüngster Zeit entdeckt worden. Sie werden uns im ersten Teil des Artikels beschäftigen. Sie dokumentieren, dass Evolution ein notwendiger und mechanistisch integraler Bestandteil von Leben ist.

2. Grundlagen und Hintergründe

2.1. Ursprung, Alter und Vielfalt von Leben

Das Alter der Erde wird heute auf mindesten 4,5 Milliarden ($4,5 \times 10^9$) Jahre geschätzt. Leben muss bereits sehr früh entstanden sein. Die ältesten fossilen Funde, die zellulär organisiertes Leben anzeigen, sind etwa $3,5 \times 10^9$ Jahre alt. Wir wissen nicht, ob Leben auf der Erde nur einmal entstanden ist. Sicher ist jedoch, dass alle heute existierenden Lebensformen den gleichen Ursprung haben. Leben auf der Erde verteilt sich auf ungefähr 1,75 Millionen rezente Arten, die sich genetisch unabhängig voneinander weiterentwickeln. Die Artenvielfalt ist uns allgegenwärtig, sie wird heute durch den etwas unscharfen Begriff der Biodiversität umschrieben. Biodiversität bringt auch zum Ausdruck, dass sich Leben jeden erdenklichen Lebensraum auf unserem Planeten erschlossen hat. Die Vielfalt unterschiedlich angepasster Lebensformen verleiht dem Leben in seiner Gesamtheit die enorme Flexibilität, die es ihm seit seiner Ent-

stehung immer wieder ermöglicht hat, verheerende Katastrophen zu überstehen, die jeweils zum Aussterben der meisten betroffenen Arten führten.

2.2. Individuen, Populationen, Fortpflanzung und Selektion

2.2.1. Individuen bilden Populationen

Individuen, die in einer Population zusammenleben, unterscheiden sich trotz enger Verwandtschaft in ihrem Erscheinungsbild (Phänotyp). Diese Variabilität im Phänotyp ermöglicht innerhalb der Population die Konkurrenz zwischen verschiedenen Phänotypen. Dabei können äußere Faktoren bestimmte Phänotypen begünstigen und andere benachteiligen. Anders ausgedrückt, die äußeren Einflüsse erzeugen einen Selektionsdruck. Natürliche Selektion bedeutet, dass innerhalb einer Population die durch ihren Phänotyp begünstigten Individuen mehr Nachkommen an die nachfolgende Generation weitergeben, als die benachteiligten. Als Population definiert man eine Gruppe von Individuen, die untereinander in ständigem genetischen Austausch stehen. Da jeder Phänotyp in seinem Genotyp (Erbgut) archiviert ist, wird sich ein durch Selektion begünstigter Phänotyp von Generation zu Generation stärker durchsetzen. Die Selektion bestimmt die Richtung einer phänotypischen Änderung. Die stetige Änderung oder verbesserte Anpassung an die herrschenden äußeren Bedingungen nehmen wir als Evolution wahr. Der kleinste messbare Schritt der Evolution ist der von einer Generation zur nächsten.

2.2.2. Geschlechtliche Fortpflanzung manifestiert Selektion

Die Selektion eines begünstigten Phänotyps erfolgt über die in allen höheren Organismen (Tiere, Pflanzen, Pilze) vorhandene geschlechtliche (sexuelle) Fortpflanzung. Funktion der geschlechtlichen Fortpflanzung ist eine wirkungsvolle Durchmischung des genetischen Materials zweier Individuen (Mutter und Vater). Die Durchmischung des genetischen Materials erfolgt in der Reifeteilung (Meiose), in der die einander entsprechenden (homologen) Erbanlagen (Gene) mütterlicher und väterlicher Herkunft des doppelten (diploiden) Chromosomensatzes wieder getrennt und auf einfache (haploide) Chromosomensätze reduziert werden. Dabei werden zum einen die homologen Chromosomen mütterlicher und väterlicher Herkunft zufällig auf die haploiden Tochterkerne verteilt, zum anderen die homologen DNA-Sequenzen der Chromosomen im Prozess der genetischen Rekombination molekular durchmischt, indem sie wie die beiden Hälften eines Reißverschlusses miteinander verschränkt und dann segmentweise gegeneinander ausgetauscht werden. In einem komplexen Prozess, der durch zahlreiche Proteine kontrolliert und katalysiert wird, entstehen zwei DNA-Stränge, in denen Gene mütterlicher und väterlicher Herkunft mosaikartig neu kombiniert sind. Jeder dieser Stränge findet sich in der Folge als mütterliches oder väterliches Chromosom in den entsprechenden Keimzellen wieder. Mit der Ver-

schmelzung der Keimzellen zweier verschiedener Individuen zur diploiden Zygote beginnt ein neuer Zyklus. Diese sich mit jeder Generation wiederholende Rekombination des Erbguts hält unter den sich fortpflanzenden Individuen einer Population einen steten Gen-Austausch aufrecht.

Beziehen wir die Selektion mit ein, bedeutet dies, dass jeder durch Selektion begünstigte Phänotyp (und seine Genotyp) von Generation zu Generation dominanter wird. Verdeutlichen wir dies durch das folgende klassische Beispiel.

2.2.3. Cyanogenese in Weißklee – Beispiel zur Selektion

Der in Mitteleuropa als Wiesenpflanze verbreitete Weißklee vertreibt Fressfeinde (Herbivoren) durch das Gift Blausäure. Im unverletzten Blatt wird Blausäure als ungiftiges cyanogenes Glycosid gespeichert. Bei Gewebeverletzung, z.B. durch den Biss eines Herbivoren, kommt das Glycosid mit dem zuvor getrennt gespeicherten Enzym β -Glucosidase in Kontakt und wird unter Freisetzung von Blausäure gespalten (Abb. 1A). Die explosionsartige Freisetzung von Blausäure nennt man Cyanogenese.

In den 1950er Jahren beobachtete Daday (1954a, b), dass in Weißklee-Populationen neben zur Cyanogenese befähigten Individuen (cyanogene Individuen) auch Individuen vorkommen, die das nicht können (acyanogene Individuen). Man spricht von Polymorphismus. In unserm Fall sind dafür zwei Gene verantwortlich, eines, das die Biosynthese des cyanogenen Glycosids betrifft (Gen A), und eines, das die β -Glucosidase codiert (Gen B). Zu jedem der beiden Gene existieren homologe defekte Gene (a und b) (Abb. 1C). Homologe Gene bezeichnet man als Allele. Weißklee-Individuen können somit, bezogen auf den Cyanogenese-Polymorphismus, vier unterschiedliche Genotypen besitzen: AB, Ab, aB und ab. Nur der doppelt dominante Genotyp AB ist cyanogen. Daday untersuchte Weißkleepopulationen in einem weiten geographischen Areal (Abb. 1B) und beobachtete dabei eine auffällige Beziehung zwischen der Häufigkeit cyanogener Populationen und den Januar-Isothermen. In Gebieten mit einer niedrigen Wintertemperatur (4° – 0°C) waren die Weißklee-Populationen vorwiegend acyanogen, während in wärmeren Gebieten mit einer mittleren Januar-temperatur über 4°C die Populationen vorwiegend cyanogen waren. Eine Erklärung dieses Phänomens gelang erst Jahre später David Jones (1966; 1978), der schlüssig zeigen konnte, dass herbivore Schnecken besonders im Frühjahr den jungen Kleepflanzen stark zusetzen. Schnecken meiden die cyanogenen Individuen und fressen bevorzugt die acyanogenen Pflanzen. In wärmeren Gebieten (mittlere Temperatur im Januar 4° bis 0°C) sind die Schnecken das ganze Jahr über aktiv, in kälteren Gebieten werden sie zu einer Winterruhe gezwungen und sind erst im späten Frühjahr wieder aktiv. Zu diesem Zeitpunkt sind die Kleepflanzen bereits so gut entwickelt, dass sie durch Schnecken nicht mehr nennenswert geschädigt werden. Dies bedeutet, dass in Gebieten, in denen die

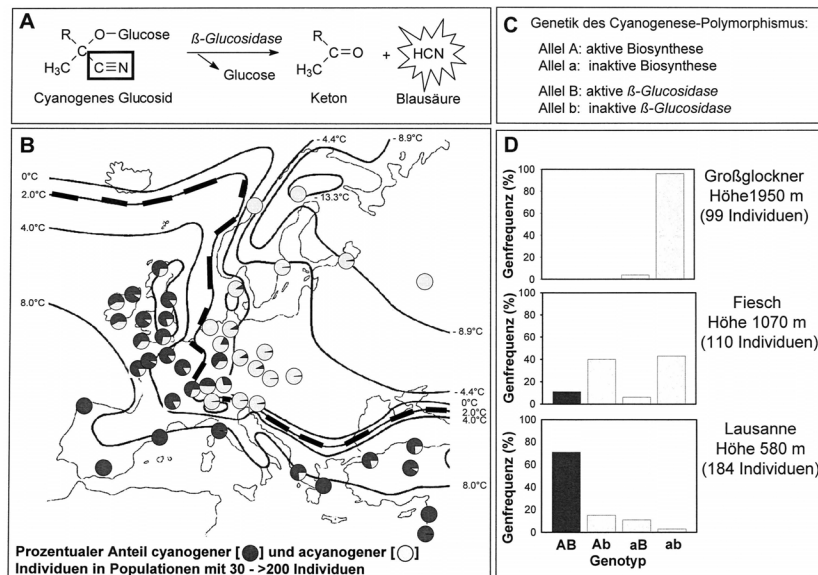


Abb. 1. Klimaabhängige Verteilung cyanogener und acyanogener Individuen in Populationen des Weißklee (*Trifolium repens*). A: Ablauf der Cyanogenese im verletzten Kleeblatt. B: Häufigkeit cyanogener und acyanogener Pflanzen in europäischen Weißklee-Populationen. Markiert sind die Januarisothermen (2°C-Isotherme ist gestrichelt). C: Die für den Cyanogenese-Polymorphismus verantwortlichen Allel-Paare. D: Häufigkeit cyanogener (AB) und acyanogener (Aa, aB, ab) Genotypen in verschiedenen alpinen Höhenlagen. Verändert nach Daday (1954a, b).

Schnecken aus klimatischen Gründen ganzjährig aktiv sind, die Selektion cyanogener Individuen begünstigt wird. Die Populationen sind entsprechend fast durchgehend cyanogen. In Gebieten, in denen die Schnecken erst später im Jahr aktiv werden, entfällt der Selektionsdruck. Da die acyanogenen Individuen ein kräftigeres Wachstum zeigen als die cyanogenen Pflanzen, ist ihre Selektion unter diesen Bedingungen begünstigt.

Die Beziehung zwischen geographischer Wintertemperatur und Cyanogenese (Abb. 1A) lässt sich auch im Gebirge (Abb. 1D) beobachten. In den Alpen nimmt die Selektion cyanogener Individuen mit steigender Höhe ab. Dies spiegelt sich in der Häufigkeit der vier Genotypen in den Populationen der drei Höhenstufen wider. Auf der Höhe von Lausanne, wo mit ganzjähriger Schneckenaktivität zu rechnen ist, dominiert der cyanogene Genotyp AB, während im rauen Klima auf Höhe des Großglockners die Allele A und B praktisch fehlen. Hier dominieren die acyanogenen Genotypen.

Dieses einfache Beispiel zeigt, dass ein bestimmter Phänotyp unter gegebenem Selektionsdruck begünstigt oder benachteiligt werden kann. Die Häufigkeit

bestimmter Allele in einer Population bezeichnet man als Gen- oder Allelfrequenz. Genfrequenzen sind ein Maß für die genetische Vielfalt einer Population. Unser einfaches Beispiel betrachtet eine ausgewählte Facette im komplexen Wechselspiel zwischen Phänotypen und dem Selektionsdruck einer sich stetig ändernden Umwelt. Das Ergebnis dieses Wechselspiels spiegelt sich in den Genfrequenzen jeder neuen Generation wider. Im Laufe der Zeit können alte Allele verschwinden und neue das Übergewicht erlangen. Die natürliche Selektion ist dabei treibende und richtunggebende Kraft, durch die eine Population optimal an die sich ändernde Umwelt angepasst wird.

2.3. Das Dilemma der DNA: stabil und doch labil

Der Phänotyp eines Individuums wird durch seine Gene kontrolliert und festgelegt. Innerhalb einer Population existieren von vielen Genen Varianten (Allele), die für die Unterschiede im Phänotyp verantwortlich sind. Ohne phänotypische und damit auch genotypische Variabilität wäre, wie im vorausgegangenen Kapitel dargelegt, natürliche Selektion und damit Evolution nicht möglich. Eine in diesem Zusammenhang interessante Frage ist, wie stabil oder labil DNA eigentlich sein muss oder sein darf.

2.3.1. Ohne genetische Stabilität kein Leben

Die genetische Information eines Lebewesens ist in einem einzigen DNA-Molekül gespeichert. In den höheren Organismen ist dieses DNA-Molekül fragmentiert und auf eine artspezifisch festgelegte Anzahl von Chromosomen (beim Menschen 23) verteilt. Jedes DNA-Molekül wird zeitlebens sorgfältig gepflegt, damit es bei jeder Zellteilung und der Fortpflanzung unversehrt an Tochterzellen oder Tochterindividuen weitergegeben werden kann.

Die Pflege der DNA beginnt mit ihrer Biosynthese, der Replikation. Bei der Replikation dienen die beiden komplementären Einzelstränge des DNA-Doppelmoleküls jeweils als Vorlage für die Synthese der Tochterstränge. Unter Beteiligung vieler Hilfsproteine und Enzyme verläuft diese Synthese mit einer Genauigkeit von 10^{-9} bis 10^{-10} . Das heißt, statistisch gesehen kann bei jedem 10^9 -ten bis 10^{10} -ten neu geknüpften Basenpaar ein Fehler vorkommen. Beim menschlichen Genom, das aus $6,6 \times 10^9$ Basenpaaren besteht, würde also bei jeder Verdopplung der gesamten DNA im Mittel ein Fehler auftreten. Unter thermodynamischen Bedingungen liegt die Genauigkeit der DNA-Synthese unter Standardbedingungen bei etwa 10^{-4} . Diese Genauigkeit würde bei weitem nicht ausreichen, um Leben selbst in Form einer einfachen Bakterienzelle über Generationen in seiner Komplexität aufrechtzuerhalten: Die hohe Genauigkeit der Replikation kommt durch eine „Korrekturlesefunktion“ zustande. Dabei überprüft eine zusätzliche Enzymfunktion jedes neu geknüpfte Basenpaar unmittelbar nach seiner Synthese und kontrolliert, ob der richtige, dem Matrizenstrang komplementäre Baustein ausgewählt wurde. Bei einer fehlerhaften Wahl wird der letzte Syntheseschritt rückgängig gemacht und damit korrigiert.

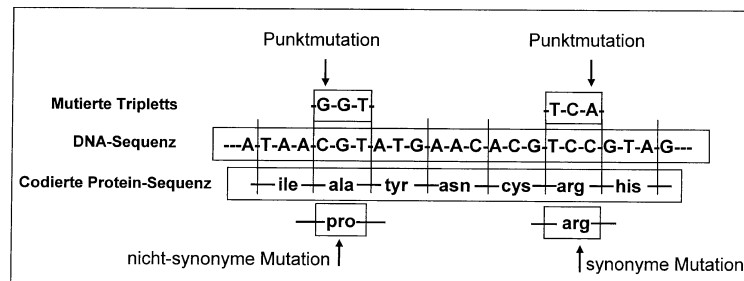


Abb. 2. Synonyme und nicht-synonyme Punktmutationen. Synonyme Punktmutationen verändern den Genotyp (DNA), nicht aber den Phänotyp (Protein) des betroffenen Individuums. Nicht-synonyme Punktmutationen verändern Genotyp und Phänotyp.

Selbst im Ruhezustand unterliegt die im Zellkern sorgfältig verwahrte DNA einem spontanen kontinuierlichen Zerfall. Basen werden abgespalten oder unter äußeren chemischen oder physikalischen (UV-Licht) Einflüssen verändert. Diese Schäden werden laufend durch DNA-Reparaturenzyme korrigiert. Die Reparaturenzyme erkennen Schäden am DNA-Doppelstrang, wenn einer der Stränge betroffen ist, und reparieren ihn mit der Information des komplementären intakten Stranges. Keine Reparatur ist möglich, wenn komplementäre Sequenzen beider Stränge gleichzeitig beschädigt sind.

2.3.2. Keine Evolution ohne genetische Stabilität und Labilität

Voraussetzung für die Erhaltung von Leben ist eine höchstmögliche Stabilität von DNA und deren nahezu fehlerfreie Reproduktion. Die Attribute „höchst-möglich“ und „nahezu“ lassen bereits vermuten, dass trotz aller Präzision gelegentliche Fehler und Defekte vorkommen können. Diese gelegentlichen Fehler (Mutationen) sind nicht Ausdruck von Unvollkommenheit, im Gegenteil, sie erzeugen genetische Variabilität als Voraussetzung für Evolution. In der klassischen Genetik wird dabei der Punktmutation, also dem Austausch einer einzigen Base in der DNA eine große Bedeutung zugemessen (Abb. 2). Da der genetische Code degeneriert ist, also für die meisten der 20 verschlüsselten Aminosäuren mehr als ein Basen-Triplett codiert, können wir zwischen synonymen und nicht-synonymen Mutationen unterscheiden (Abb. 2). Eine synonyme Mutation, z.B. die Umwandlung des Codons TCC in TCA, hat keine Auswirkung auf den Phänotyp (das codierte Protein), da auch das mutierte Codon (TCA) für die Aminosäure Arginine (arg) codiert. Anders bei einer nicht-synonymen Mutation – hier verändert ein Basenaustausch im Triplett (z.B. CGT zu AGT) auch den Phänotyp, da das Codon AGT nicht mehr Alanin (ala), sondern Prolin (pro) codiert.

Tabelle 2. Evolutionsraten einiger essentieller Proteine für synonyme und nicht-synonyme Mutationen (verändert nach Ridley (2004)).

Gen	Evolutionsrate*	
	nicht-synonym	synonym
Albumin	0,92	5,16
α -Globin	0,56	4,38
Parathormon	1,00	3,57
Ribosomales S14-Protein	0,02	2,16
45 Gene (Mittelwert)	0,74	3,51
Pseudogene (Mittelwert)	3,9	

* Die Evolutionsrate wird ausgedrückt als Anzahl der Austausche von Aminosäuren oder Nucleotiden, die im Mittel jede Position einer Aminosäure im Protein oder jede Position eines Nucleotids im Gen in 10^9 Jahren treffen.

Während synonyme Mutationen keine Auswirkung auf den Phänotyp haben, können sich nicht-synonyme Mutationen vorteilhaft, nachteilig oder neutral auswirken. Die Unterscheidung zwischen synonymen und nicht-synonymen Mutationen bietet damit die Möglichkeit, die Rolle der natürlichen Selektion für die Evolution quantitativ zu erfassen. Dies gilt besonders für die negative Selektion (angelsächsisch anschaulich „*purifying selection*“), die benachteiligte Phänotypen und ihre mutierten Genotypen ausmerzt. Da synonyme Mutationen den Phänotyp nicht verändern, unterliegen sie im Gegensatz zu nicht-synonymen Mutationen keiner Selektion. Die durch Selektion bereinigten Mutationsraten bezeichnet man als Evolutionsraten (Tabelle 2). Zu ihrer Berechnung vergleicht man homologe Proteine aus Arten, von denen man weiß, vor wie viel Millionen Jahren sie sich von ihrem letzten gemeinsamen Vorfahren getrennt haben. Niedrige nicht-synonyme Evolutionsraten charakterisieren konservative Proteine, die elementare Lebensfunktionen kontrollieren (Beispiel: ribosomale Proteine). Die meisten nicht-synonymen Mutationen wurden hier über die Jahrmilliarden hinweg durch negative Selektion bereinigt. Nur wenige Mutationen erwiesen sich in späteren Lebensformen als vorteilhaft und wurden durch positive Selektion bewahrt.

Tabelle 2 enthält auch Evolutionsraten für Pseudogene. Pseudogene sind DNA-Sequenzen, die codierenden Genen ähneln, aber keinen Phänotyp haben und damit auch keiner Selektion unterliegen. Man kann sie deshalb als Standard zur Berechnung von Mutationsraten verwenden (Nachmann und Crowell, 2000). Wir kommen später auf die Bedeutung der Pseudogene zurück (Kap. 4.1).

Halten wir fest, dass in der Evolution von Leben einmal bewährte Merkmale über beliebig lange Zeiträume nahezu unverändert bewahrt werden können. Nachteilige Mutationen werden durch negative Selektion ihres Phänotyps bereinigt. Die Bewahrung einmal bewährter Merkmale ist zweifellos eine wesentliche Eigenschaft der Evolution von Leben. Allerdings entstehen dadurch weder neue Merkmale noch Vielfalt, die sicher auffälligsten Eigenschaften der Evolution. Phänotypische Neuheiten und Vielfalt entstehen dort, wo Leben sich an die stetig wechselnden Einflüsse der Umwelt anpassen muss. Hier sorgt die positive Selektion dafür, dass sich jeweils die am besten angepassten Phänotypen in der Population durchsetzen, wie im Beispiel der cyanogenen und acyanogenen Weißklee-Populationen (Kap. 2.2.3.). Die Entstehung besser angepasster Phänotypen wird in der klassischen Genetik vor allem durch Punktmutationen erklärt, die den Phänotyp zufällig vorteilhaft verändern. Wir werden gleich sehen, dass diese Erklärung zu einfach ist und keineswegs allein ausreicht, um Evolution durch positive Selektion ausreichend zu erklären. Verdeutlichen wir uns aber zunächst an einem Beispiel das Wirken von negativer und positiver Selektion.

2.3.3. Negative und positive Selektion: Beispiel Stoffwechsel der Pflanzen

Der Stoffwechsel der Pflanze lässt sich in Primär- und Sekundärstoffwechsel unterteilen (Hartmann 1996; 2007). Die beiden Stoffwechselbereiche verdeutlichen anschaulich die Rolle und Bedeutung der negativen und positiven Selektion und gleichzeitig die Bedeutung von struktureller Stabilität und Labilität der DNA für die Evolution (Abb. 3).

Der Primärstoffwechsel (Abb. 3A) umfasst alle für Wachstum und Entwicklung eines Individuums notwendigen Prozesse. Er gilt, von gelegentlichen kleinen Varianten abgesehen, einheitlich für alle Pflanzen. Beispiele sind Prozesse wie Photosynthese, Atmung, Aufbau und Abbau von Kohlenhydraten, Fetten, Proteinen und Nukleinsäuren. Geringste Fehler bei einem dieser Prozesse können gravierende Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit des betroffenen Individuums haben. Die Prozesse des Primärstoffwechsels unterliegen der ständigen Reinigung durch negative Selektion und haben sich deshalb in den vielen Millionen Jahren Evolution kaum verändert.

Der Sekundärstoffwechsel (Abb. 3B) umfasst alle Prozesse und Produkte, die der Pflanze das Überleben in ihrer Umwelt sichern. Er ist vielfältig und unterscheidet sich markant von Art zu Art. Man kennt aus Pflanzen mehr als 200 000 sekundäre Pflanzenstoffe. Es handelt sich dabei genau um die Stoffe, die uns Menschen Pflanzen so besonders und unverwechselbar machen: die Duft- und Farbstoffe der Blüten und Früchte, die Scharf- und Aromastoffe aus Gewürzen, Obst und Gemüse, aber auch hochwirksame Gifte und Rauschmittel. Die pharma-

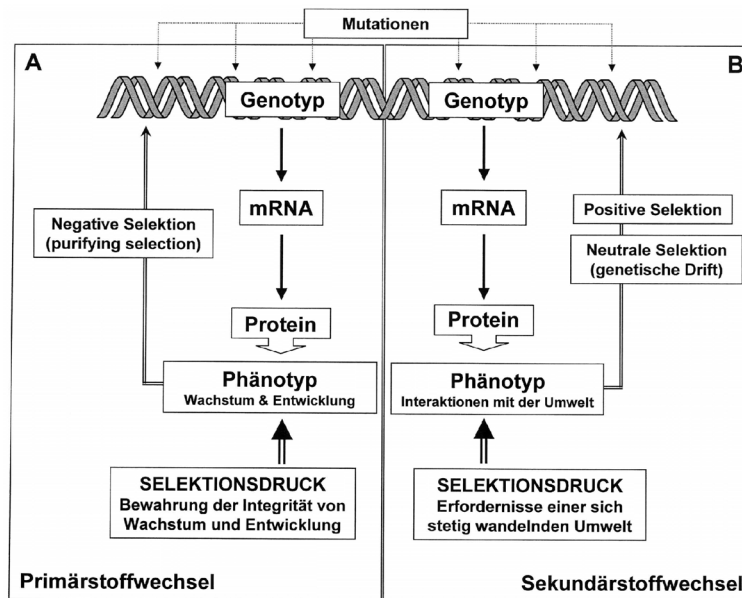


Abb. 3. Primär- und Sekundärstoffwechsel der Pflanzen. Der Primärstoffwechsel (A) umfasst alle für Wachstum und Entwicklung notwendigen Prozesse. Er unterliegt einer strengen negativen Selektion. Der Sekundärstoffwechsel (B) umfasst alle zur Anpassung an die wechselnden Bedingungen der Umwelt erforderlichen Prozesse. Er unterliegt einer stetigen positiven Selektion.

kologische Wirkung vieler Sekundärstoffe nutzt der Mensch seit Urzeiten zu Heilzwecken. Für die Pflanze selbst erfüllen die von Art zu Art unterschiedlichen Sekundärstoffausstattungen eine lebenserhaltende Rolle in den mannigfaltigen Wechselwirkungen mit ihrer Umwelt. Eine hervorragende Bedeutung haben Sekundärstoffe in der chemischen Abwehr pflanzenfressender Tiere (Herbivoren) und pathogener Bakterien und Pilze. Sie dienen aber auch zur Anlockung tierischer „Helfer“, die durch Fremdbestäubung und Samenverbreitung die Fortpflanzung und Vermehrung der Pflanze sichern und dafür mit Nektar und zuckerhaltigem Fruchtfleisch belohnt werden. Zwischen jeder Pflanze und ihrer Umwelt besteht über den Sekundärstoffwechsel ein komplexes und dynamisches Wechselspiel, das bei jeder äußeren Veränderung variabel angepasst wird.

Der Sekundärstoffwechsel ist ein hervorragendes Terrain, wenn es darum geht verstehen zu lernen, wie neue, oft auf wenige Arten beschränkte Sekundärstoffe und die für ihre Synthese verantwortlichen Biosynthesewege evolutionär entstehen. Allerdings reichen unsere bisherigen Vorstellungen nicht aus, um die Evolution neuer Stoffwechselwege und der sie katalysierenden Enzyme zu er-

klären (Pichersky und Gang 2000; Ober 2005). Neue Erkenntnisse, die erst durch die Fortschritte der molekularen Genetik möglich wurden, haben das Bild der molekularen Evolutionsforschung erheblich erweitert. Ihnen sind die folgenden Kapitel gewidmet.

3. Mechanismen der Evolution

3.1. Evolution durch Variation und Artenbildung

Die bisherige Betrachtung erklärt die Evolution eines neuen Phänotyps durch Mutation und positive Selektion. Damit lässt sich leicht die Wandlung vorhandener Phänotypen in neue, besser angepasste erklären. Aus einem Apfelbaum mit kleinen Äpfeln kann man Bäume mit größeren Äpfeln züchten. Das praktizieren Pflanzenzüchter empirisch seit dem Altertum. Auch komplexere evolutionäre Entwicklungen und Neuheiten lassen sich durch schrittweise Veränderung vorhandener Phänotypen erklären. Etwa die Evolution der Lunge der Landtiere aus der Schwimmblase ihrer im Wasser lebenden Vorfahren (Knochenfische) oder die Evolution unserer Hände (Benutzung von Werkzeugen) und der Flügel der Vögel (Eroberung des Luftraumes) aus den Vordergliedmaßen eines gemeinsamen Vorfahren (ursprüngliche Landwirbeltiere) (Carroll 2006).

Trotz der hohen Anzahl verschiedener Arten und deren vielfältigem Erscheinungsbild sind die gemeinsamen genetischen Wurzeln der Organismen erstaunlich konservativ und oft nach Milliarden Jahren getrennter Evolution noch gut erkennbar (Abb. 4). Rund ein Fünftel aller Gene im Genom des modernen Menschen stimmt mit Genen der heutigen Bakterien überein, obwohl sich die Evolution des Menschen von der der rezenten Bakterien vor mehr als drei Milliarden Jahren getrennt hat. Die meisten dieser Gene codieren essentielle Funktionen, die sich in allen Lebensformen wiederfinden. Sie wurden durch strenge negative Selektion bis heute bewahrt. Mit Pflanzen und Pilzen teilt der Mensch immerhin noch mehr als die Hälfte seiner Gene, mit der Maus sogar 99%. Abb. 4 verdeutlicht, dass viele Gene seit Ursprung des zellulären Lebens bis heute überlebt und im Zuge der Evolution neuer Lebensformen andere oder veränderte Funktionen erworben haben. Ganz offensichtlich haben sie aber auch Gesellschaft durch völlig neue Gene bekommen, die es vorher noch nicht gab. Woher stammen diese neuen Gene? Das nächste Kapitel gibt die Antwort.

3.2. Evolutionäre Innovation durch Genduplikation

Vor 40 Jahren erkannte Ohno (1970) als einer der ersten die Bedeutung einer dauerhaften Verdopplung eines Gens (Genduplikation) für die Evolution. In seiner klassischen Hypothese postulierte er, dass nach der Verdopplung eines Gens eine Kopie die ursprüngliche Funktion beibehält, während die andere längerfristig durch Selektion vorteilhafter Mutationen eine neue Funktion (Neofunktionalisierung) erlangen kann. Ohnos Hypothese lebte lange Zeit im

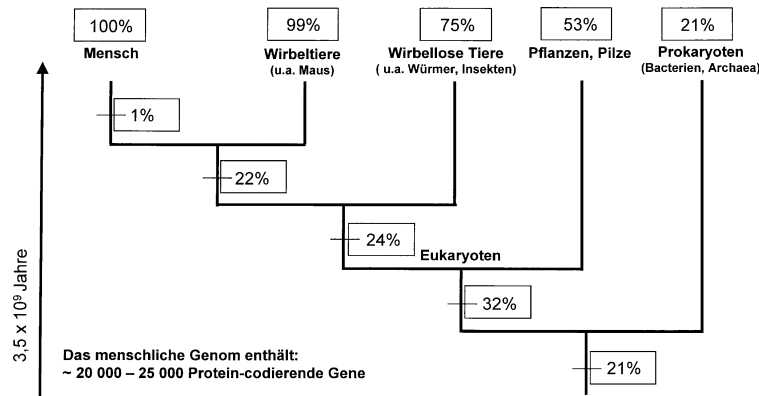


Abb. 4. Geschichte der Gene des menschlichen Genoms. Es sind nur Gene berücksichtigt, die Proteine codieren. Die Ziffern über den Taxa geben an wie viel Prozent der Gene sich im menschlichen Genom wiederfinden. Der Anteil menschlicher Gene, die dem jeweiligen phylogenetischen Ast entstammen, steht an den Verzweigungen des Stammbaums. So stimmen noch 21% der Gene des modernen Menschen mit den Genen der einfach organisierten rezenten Prokaryoten überein; gut die Hälfte (53%) seiner Gene hat der Mensch mit nicht-tierischen Eukaryoten (Pflanzen und Pilzen) gemeinsam. Die zugrunde liegenden Daten stammen hauptsächlich aus internationalen Genomprojekten. Verändert nach Ridley (2004).

Verborgenen, bis die Erkenntnisse der moderne Molekularbiologie und Genetik sie 15 bis 20 Jahre später wieder aufleben ließ. Heute wissen wir, dass die Genduplikation eine wesentliche Voraussetzung für die Entstehung evolutionärer Neuheiten und Vielfalt darstellt. Es gibt mehrere Mechanismen, die zu einer Genverdopplung führen können; wir beschränken uns hier auf die zwei, nach heutiger Einschätzung wichtigsten Mechanismen: die Genommutation und die Segmentmutation. Beide sind wie alle Mutationen Zufallsereignisse.

3.2.1. Genduplikation durch Polyploidisierung

Genommutationen sind seit langem bekannt. Es handelt sich um eine zahlenmäßige Veränderung der Anzahl der Chromosomen eines Individuums. Dabei können einzelne Chromosomen in ihrer Anzahl verändert (Aneuploidien) oder komplette Chromosomensätze verdoppelt werden (Polyploidien).

Aneuploidien sind beim Menschen als Ursache für Behinderungen bekannt, wie das Down-Syndrom, bei dem das Chromosom 21 in den diploiden Körperzellen in dreifacher Ausfertigung (Trisomie) vorliegt. Aneuploidien entstehen durch fehlerhafte Verteilung der Chromosomen bei Kernteilungen.

Polyploidien sind vor allem aus dem Pflanzenreich bekannt. Viele unserer Kulturpflanzen wurden künstlich polyploidisiert, da die Nachkommen mit vermehrt

ten Chromosomensätzen oft robustere und ertragreichere Sorten lieferten. Inzwischen wird deutlich, dass Genom-Mutationen, bei denen Genome vollständig oder größtenteils verdoppelt wurden, in der Evolution aller Organismen eine wichtige Rolle gespielt haben. In der Evolution der bedecktsamigen Blütenpflanzen (Angiospermen) haben Polyploidisierungen sogar wiederholt stattgefunden (Adams and Wendel 2005). Im Genom der genetischen Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* lassen sich die Spuren von drei Genomverdopplungen nachweisen und zeitlich datieren (Abb. 5). Die eigentlich aufregende Erkenntnis ist dabei, dass in den auf eine Verdopplung folgenden Jahrtausenden weiterer Evolution und Artenbildung viele der homologen Gene wieder verloren gegangen sind, während andere behalten wurden, um alte Funktionen zu verstärken oder neu zu übernehmen. Das Genom der rezenten *Arabidopsis*-Populationen enthält auf seinen fünf Chromosomen eine bunte Mischung von singulären, einfach duplizierten und mehrfach duplizierten Genen aus allen historischen Duplikationsereignissen. Bei diesem Vorgang wurden durch Fusion, Verlagerung und Verlust von DNA-Segmenten Chromosomen aufgelöst und neu arrangiert (Henry et al 2006). Es handelte sich um zufällige Veränderungen in der Chromosomenarchitektur, die unter dem Begriff Chromosomenmutationen seit langem bekannt sind. Auch im Laufe unseres Lebens verändern sich vor allem durch äußeren chemischen oder physikalischen (energiereiche Strahlung) Einfluss die Genome unserer Körperzellen durch Chromosomenmutationen: Verlust von Chromosomensegmenten, Translokation eines Segments von einem Chromosom auf ein anderes, Fragment-Inversionen und -Verdopplungen, etc. In Keimzellen werden Chromosomenmutationen in der Regel nicht toleriert; sie führen zumeist zu nicht lebensfähigen Nachkommen. In geologischen Zeiträumen, wie den mehr als 200 Millionen Jahren Angiospermen-Entwicklung (Abb. 5), können jedoch Chromosomenmutationen zu einer Neuordnung des Genoms führen, vor allem als Folge von Genom-Duplikationen. Da Genom- und Chromosomenmutationen mit phänotypischen Änderungen einhergehen, unterliegen sie genauso wie jede Punktmutation der Selektion und müssen sich Schritt für Schritt durch positive Selektion in der Population behaupten.

3.2.2. Genduplikation durch ungleiches Crossover (Segmentduplikation)

Bei der Rekombination des Erbguts während der Meiose werden durch Crossover DNA-Segmente zwischen homologen Chromatiden ausgetauscht (Kap. 2.2.2.; Abb. 6A). Bei diesem Vorgang treten gelegentlich Fehler durch Fehlanpassung (*mismatching*) der beiden homologen Chromatiden auf, die zu einem ungleichen Crossover (*unequal crossover*) führen (Abb. 6B). Dabei entsteht ein Chromatid, dem ein DNA-Segment fehlt (Deletion), während der andere das Segment doppelt enthält (Addition). Wenn das ausgetauschte Segment die Sequenz eines kompletten Gens enthält, hat eine Genduplikation stattgefunden.

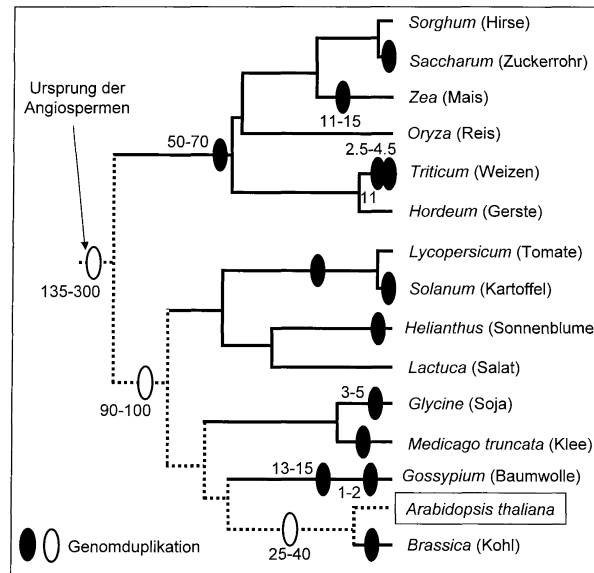


Abb. 5. Polyploidisierungs-Ereignisse in der Evolution der Angiospermen. Die Zahlen am phylogenetischen Baum markieren die grob geschätzten Zeitpunkte (vor Millionen Jahren) der Duplikationsereignisse. Die Evolution der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) mit insgesamt drei Duplikationsereignissen (weiße Ellipsen) ist durch gestrichelte Linien markiert. Verändert nach Adams und Wendel (2005).

Folgen die Sequenzen des verdoppelten Gens unmittelbar aufeinander, spricht man von einer Tandem-Anordnung. Die darin sich wiederholenden Sequenzen können bei einer späteren Rekombination eine Fehlanpassung begünstigen (Abb. 6C). Im Genom findet man gelegentlich lange Reihen von „in tandem“ angeordneten Genduplikaten.

3.2.3. Paraloge, Orthologe und Genfamilien

Mit Entdeckung der Genduplikation reicht der Begriff der Homologie nicht mehr aus, um Gene zu beschreiben, die einen gemeinsamen Ursprung haben. Man unterscheidet deshalb heute zwischen paralogen Genen, die durch Duplikation entstanden sind (Abb. 7A) und orthologen Genen, wenn man homologe Gene phylogenetisch verwandter Arten vergleicht (Abb. 7B). Manche paraloge Gene kommen in größerer Anzahl vor und bilden Genfamilien (Abb. 7C). Die einzelnen Gene einer Genfamilie können auf einem Chromosom angeordnet (Entstehung durch Tandem-Duplikation) oder auf mehrere Chromosomen verteilt sein (Entstehung durch frühere Genommutationen und Genomneuordnung, Kap. 3.2.1.).

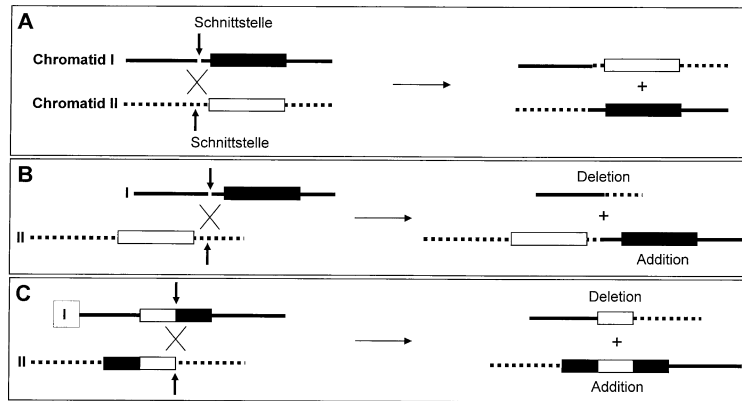


Abb. 6. Genduplikation durch fehlerhaftes Crossover bei der genetischen Rekombination. A: Normales Crossover; die Boxen symbolisieren homologe Gene. B: Ungleiches Crossover (*unequal crossover*) durch Fehlanpassung (*mismatching*) der beiden homologen Chromatiden. C: Tandem-Duplikation; weitere Fehlanpassungen beim Crossover werden begünstigt, wenn die Gene bereits in Tandem-Anordnung vorliegen.

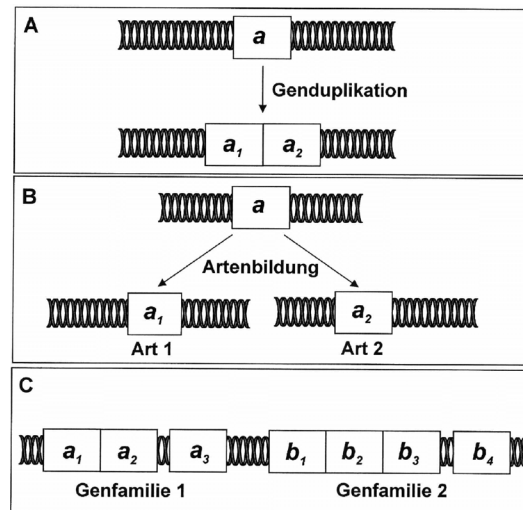


Abb. 7. Paraloge, Orthologe und Genfamilien. A: Paraloge Gene sind durch Genduplikation entstandene homologe Gene. B: Orthologe Gene sind die homologen Gene phylogenetisch verwandter Arten. C: Durch wiederholte Genduplikation entstandene Gruppen paraloger Gene werden in Genfamilien zusammengefasst.

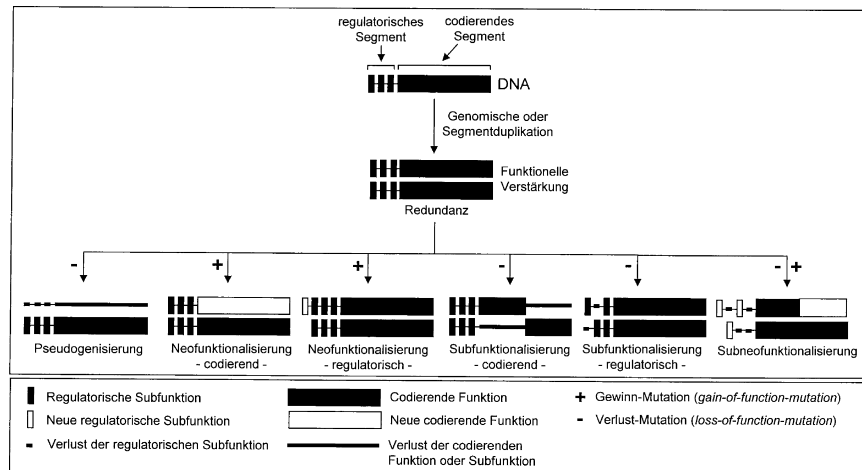


Abb. 8. Modellvorstellungen zum weiteren Schicksal duplizierter Gene. Verändert und erweitert nach Moore und Purugganan (2005).

4. Das evolutionäre Schicksal duplizierter Gene

Jedes duplizierte Gen, gleichgültig durch welchen Mechanismus es geboren wurde, muss sich zunächst in der Population durchsetzen. Die meisten Duplikate überleben bereits die nächsten Fortpflanzungszyklen nicht, entweder wegen eines nachteiligen Phänotyps oder weil sie bei der Rekombination wieder eliminiert werden. Für das Schicksal der in der Population stabilisierten duplizierten Gene gibt es verschiedene hypothetische Möglichkeiten (Moore und Purugganan 2005; He und Zhang 2005; Ober 2010) (Abb. 8):

- 1. Pseudogenisierung:** Eine Kopie führt die Funktion des Stammgens unverändert fort, die zweite Kopie verliert ihre Funktion (Nichtfunktionalisierung) und wird zum Pseudogen.
- 2. Funktionsverstärkung:** Beide Kopien führen die Funktion des Stammgens fort, die dadurch verstärkt wird.
- 3. Neofunktionalisierung:** Eine Kopie führt die Funktion des Stammgens unverändert fort, die zweite Kopie erlangt eine neue Funktion.
- 4. Subfunktionalisierung:** Die Kopien erleiden Verlustmutationen und teilen sich komplementär die alte Funktion.
- 5. Subneofunktionalisierung:** Die Kopien erleiden zunächst komplementäre Verlustmutationen und erlangen dann zusätzlich neue Funktionen.

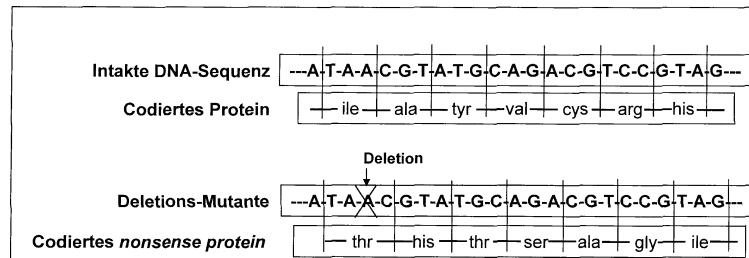


Abb. 9. Punktmutationen, die den Verlust eines Nucleotids (Deletion) oder den Einbau eines zusätzlichen Nucleotids (Insertion) verursachen, verschieben den Leserahmen der DNA und verändern damit den Sinn der nachfolgenden Codons (Basen-Triplets). Dies führt zur Bildung funktionsloser Proteine (*nonsense proteins*).

4.1. Pseudogenisierung

Die Pseudogenisierung ist das häufigste Schicksal duplizierter Gene. Pseudogene entstehen durch Mutationen, die die Funktion des Gens ausschalten. Dazu gehören in erster Linie Deletionen und Insertionen, die den Leserahmen der DNA verschieben (*frame-shift mutations*) (Abb. 9). Mutationen im Bereich der regulatorischen Segmente (Abb. 8) können zum völligen Verlust der Transkription führen. Das Gen wird zum Schweigen gebracht (*silencing*). Da Pseudogene keinen Phänotyp haben, unterliegen sie auch keiner Selektion. Ihre Chance, langfristig im Genom zu überleben, ist gering. Man schätzt die durchschnittliche Halbwertszeit der Pseudogene auf etwa vier Millionen Jahre (Lynch and Conery 2003).

Pseudogenisierung kann jedes Gen treffen, dessen Phänotyp keiner Selektion mehr unterliegt. Ein eindrucksvolles Beispiel ist der menschliche Geruchssinn. Die verschiedenen Geruchsstoffe werden durch olfaktorische Rezeptoren in der Riechschleimhaut der Nase wahrgenommen und über sensorische Neuronen an das Zentralnervensystem weitergemeldet. Die olfaktorischen Rezeptoren werden durch eine große Genfamilie codiert, die bei landlebenden Wirbeltieren bis zu 1000 Gene umfasst. Beim Menschen besteht die Genfamilie aus 855 Genen, von denen aber nur 370 funktionsfähig sind. Weitere 425 Gene sind funktionslose Pseudogene und von etwa 60 Genen kennt man aus menschlichen Populationen funktionsfähige und pseudogenisierte Allele (Hesin-Brumshtein et al 2009). Der zunehmende Verlust des Geruchssinnes, der nicht nur beim Menschen, sondern bei allen höheren Primaten zu beobachten ist, wird mit der evolutionären Verbesserung des Sehvermögens bei den höheren Primaten in Zusammenhang gebracht. Im Gegensatz zu fast allen übrigen Säugetieren besitzen die höheren Primaten drei statt nur zwei farbwahrnehmende Pigmente (trichro-

matisches Farbsehen). Dadurch können sie ihre Umwelt visuell wesentlich differenzierter wahrnehmen als andere Säugetiere. Ihr Geruchssinn hat deshalb an Bedeutung verloren.

Das Beispiel der olfaktorischen Gene zeigt, dass Pseudogene trotz des Verlusts ihrer Funktion keineswegs uninteressant sind – sie geben als „molekulare Fossilien“ wichtige Antworten auf mögliche historische Richtungswechsel in der Evolution.

4.2. Funktionelle Verstärkung durch Genverdopplung

In Einzelfällen kann eine durch Verdopplung eines Gens verstärkte Expression des codierten Phänotyps für die betroffene Population vorteilhaft sein. In diesem Fall würden beide Kopien trotz funktioneller Redundanz erhalten bleiben. Beispiele für eine solche quantitative Verstärkung durch Wiederholung funktionell identischer Gene (man spricht von „*dose repetitions*“) sind die Gene für ribosomale RNA (rRNA) und Transfer-RNA (t-RNA), die beim Anschalten der Proteinsynthese rasch in großen Mengen verfügbar sein müssen. Auch die Gene für die DNA-bindenden Histone, die bei der Replikation von DNA kurzzeitig in großen Mengen benötigt werden, sind in mehreren Kopien vorhanden.

4.3. Neofunktionalisierung

Das dauerhafte Überleben beider Kopien eines duplizierten Gens ist, abgesehen von der gerade besprochenen Funktionsverstärkung, nur möglich, wenn beide Kopien unter Selektion verschiedene Funktionen erlangen. Im einfachsten Fall, den bereits Ohno (1970) postulierte, führt eine Genkopie die Funktion des Stammgens unverändert weiter, während die andere, frei von funktionellen Zwängen, eine neue Funktion erlangen kann. Diese Neofunktionalisierung setzt Mutationen voraus, die vorteilhafte Phänotypen erzeugen (positive oder Gewinn-Mutationen), die sich dann durch Selektion durchsetzen (Abb. 8). Problem dabei ist, dass positive Mutationen im Vergleich zu negativen Mutationen (Verlust-Mutationen) seltener zu erwarten und damit sehr viel unwahrscheinlicher sind. Diesem Umstand tragen die beiden folgenden Modelle Rechnung.

4.4. Subfunktionalisierung

Das Subfunktionalisierungs-Modell geht davon aus, dass sich die Funktion des Stammgens nach Duplikation komplementär auf seine beiden Kopien verteilt. Damit werden beide durch positive Selektion erhalten. Das Modell wurde als Duplikations-Degenerations-Komplementaritäts-Modell (DDC-Modell) bekannt (Force et al 1999; Roth et al 2007). Seine Attraktivität besteht darin, dass es auf den relativ häufigen Verlust-Mutationen beruht (Abb. 8). Es hat aber noch einen weiteren Vorteil, es erklärt durch die Arbeitsteilung die Schaffung von funktioneller Vielfalt. In den Genomen aller höheren Organismen finden sich Gene und

Genfamilien, die offensichtlich in der Vergangenheit durch Duplikation und Subfunktionalisierung entstanden sind. Die Evolution vieler Enzyme geht wahrscheinlich auf diesem Wege auf gemeinsame Vorfahren zurück. Bekannte Beispiele sind die Verdauungsenzyme Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin, die mit unterschiedlicher Spezifität die mit der Nahrung aufgenommenen Proteine abbauen. Der gemeinsame Vorfahre der drei Enzyme besaß vermutlich noch eine sehr breite Substratspezifität.

Subfunktionalisierung betrifft nicht nur duplizierte Strukturgene, sondern, vermutlich sogar häufiger, deren regulatorische Segmente. Diese kontrollieren, wann und wo ein Strukturgen „angeschaltet“ (exprimiert) oder „abgeschaltet“ wird (Abb. 8). So kann ein Strukturgen, das vor seiner Duplizierung in allen Organen einer Pflanze „angeschaltet“ wurde, nun differenziell durch eine Genkopie nur in der Wurzel und die andere nur in den oberirdischen Organen exprimiert werden.

4.5. Subneofunktionalisierung

Dieses Modell trägt der Beobachtung Rechnung, dass die Evolution neuer Funktionen in manchen Fällen auf rasche Subfunktionalisierung von Genduplikaten folgen kann (He and Zhang 2005). Das Modell kombiniert Subfunktionalisierung mit Neofunktionalisierung und erklärt die Evolution der großen Zahl neuer Funktionen nach Genduplikation. Ein denkbare Beispiel ist die in Kapitel 4.1. besprochene Genfamilie der olfaktorischen Rezeptoren, deren Evolution man durch Tandem-Duplikationen mit anschließender Subneofunktionalisierung erklären kann. Das Modell würde recht einfach die enorme funktionelle Spezialisierung mit bis zu 1000 unterschiedlichen olfaktorischen Rezeptoren bei Wirbeltieren erklären.

5. Promiskuitive Enzyme: Phänotypen für positive Selektion

Bei allen Überlegungen zum Schicksal duplizierter Gene sollte nie vergessen werden, dass allein der Phänotyp über das Schicksal der betroffenen Gene entscheidet. So ist im Falle eines Enzyms eine Subfunktionalisierung naturgemäß nur denkbar, wenn das Enzym vor der Duplikation seines Gens bereits mindestens zwei verschiedene Substrate umsetzt. Tatsächlich erfüllen diese Voraussetzung nur wenige Enzyme. Die meisten, so steht es zumindest in den Biochemielehrbüchern, sind streng substratspezifisch, d.h. sie überführen nur ein Substrat in ein definiertes Produkt. Bei genauerer Betrachtung setzen jedoch fast alle substratspezifischen Enzyme mit geringer Aktivität (Nebenaktivität) auch andere Substrate um. Zumeist handelt es sich um Verbindungen, die mit dem Hauptsubstrat strukturverwandt sind. Solche Nebenaktivitäten werden griffig unter dem Begriff der Enzym-Promiskuität zusammengefasst.

Obwohl promiskuitive Enzymaktivitäten funktionell keine Rolle spielen, sind sie für die molekulare Evolution außerordentlich wichtig. Denn aus jeder pro-

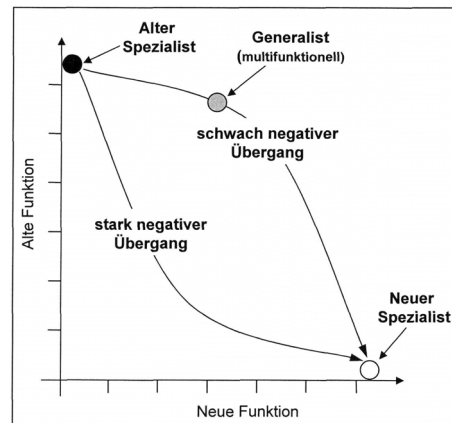


Abb. 10. Enzym-Promiskuität ermöglicht die Evolution neuer enzymatischer Funktionen. Das ursprüngliche Enzym (alter Spezialist) katalysiert die Umsetzung seines Hauptsubstrates (alte Funktion). Gleichzeitig zeigt es eine geringe promiskuitive Aktivität (neue Funktion) gegenüber einem Nebensubstrat. Unter positivem Selektionsdruck kann die promiskuitive Nebenaktivität schrittweise optimiert werden. Der Prozess kann Zwischenzustände durchlaufen, in denen das Enzym gute Aktivitäten mit beiden Substraten aufweist (multifunktioneller Generalist). Am Ende des evolutionären Prozesses steht ein neuer Spezialist. Verändert nach Khersonsky et al (2006).

miskuitiven Aktivität kann sich, sofern Selektion dies begünstigt, eine neue Hauptaktivität entwickeln (Abb. 10). Nehmen wir ein Enzym (alter Spezialist), das neben seiner Hauptaktivität (alte Funktion) eine geringe promiskuitive Aktivität (neue Funktion) besitzt. Unter Selektion kann aus dem alten Spezialisten ein neuer Spezialist entstehen. Der Prozess durchläuft dabei Zwischenzustände, in denen das Enzym beide Funktionen mit guter Aktivität katalysiert, wie der „Generalist“ in der oberen, konvexen Kurve. Mutagenese-Experimente im Labor, bei denen gezielt Aminosäuren ausgetauscht werden, bis ein Enzym eine neue Reaktion mit guter Aktivität katalysiert, haben gezeigt, dass schwach negative Übergänge häufig vorkommen (Khersonsky et al 2006). Die Evolution eines „Generalisten“, der bereits die neue Funktion mit guter Aktivität katalysiert, ohne die alte nennenswert zu schwächen, hat eine weitere, reizvolle Konsequenz: Die Evolution des Generalisten könnte nämlich bereits vor einer Genduplikation erfolgen, sofern die Selektion beide Aktivitäten begünstigt (DePristo 2007). Bei einer späteren Genduplikation hätten beide Kopien durch komplementäre Subfunktionalisierung und Optimierung ihrer Aktivitäten von Beginn an gute Überlebenschancen.

Die Evolution einer promiskuitiven Enzymaktivität zur Hauptaktivität ist an Hand vieler Beispiele molekular gut untersucht und verstanden. Oft genügen

wenige Aminosäure-Austausche durch nicht-synonyme Mutationen im Bereich des katalytischen Zentrums des Enzymproteins, um die Substratspezifität zu verändern. Neofunktionalisierung durch Selektion positiver Mutationen ist also vielleicht gar nicht so unwahrscheinlich (s. Kap. 4.3.).

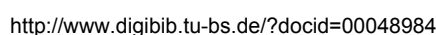
6. Molekulare Evolution im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel

Sekundärstoffwechsel wurde bereits vorgestellt (Kap. 2.3.3.). Jede der mehr als 260 000 Pflanzenarten hat unter dem wechselnden Selektionsdruck ihres Lebensraums im Verlaufe vieler Jahrtausende ihren eigenen unverwechselbaren Sekundärstoffwechsel herausgebildet und stetig neuen Bedingungen angepasst (Hartmann 2007). Der Sekundärstoffwechsel bietet in großer Vielfalt faszinierende Beispiele zur Evolution neuer Biosynthesewege und den zugrunde liegenden Mechanismen. Einige Beispiele sollen dies im Folgenden belegen.

6.1. Funktionelle Diversifizierung von Polyketidsynthasen

Eine wichtig pflanzliche Polyketidsynthase ist die ubiquitär vorkommende Chalcon-Synthase (*CHS*) (Abb. 11A). Das Enzym verknüpft sein Startersubstrat Zimtsäure mit drei Bausteinen Essigsäure zu einem Polyketid (Name!), aus dem unter Ringschluss das Produkt Chalcon gebildet wird. Chalcon ist die gemeinsame Vorstufe der in allen Pflanzen vorkommenden Flavonoide. Die mehr als 7000 Flavonoide haben vielfältige Funktionen als Blütenfarbstoffe, Gerbstoffe und Abwehrstoffe. Neben der *CHS* wurden aus Blütenpflanzen weitere Polyketidsynthasen isoliert. Der Sequenzvergleich ihrer Proteine und der sie codierenden DNA beweist eine enge Verwandtschaft mit der *CHS* (Austin und Noel 2003). Wenn man die Sequenzähnlichkeiten aller Vertreter dieser großen Genfamilie in einem molekularen Ähnlichkeitsbaum darstellt, erkennt man zwei deutlich abgegrenzte Cluster. Der eine Cluster umfasst alle *CHS* (Abb. 12A, Cluster nicht aufgeschlüsselt), der andere alle sogenannten Nicht-Chalcon-Synthasen (*NCHS*) (Abb. 12B). Während sich im *CHS*-Cluster nur Polyketid-synthasen finden, die Chalcon synthetisieren, umfasst der *NCHS*-Cluster Polyketidsynthasen, die in großer Vielfalt die unterschiedlichsten Polyketide synthetisieren. Die Strukturen dieser Polyketide sind in Abb. 12B wiedergegeben (Beerhues und Liu 2009). Ohne auf Einzelheiten dieser Strukturen eingehen zu müssen, können wir zur Evolution der pflanzlichen Polyketidsynthasen verschiedene mechanistische Aussagen machen:

1. Vermutlich zu Beginn der Angiospermen-Entwicklung (grob geschätzt vor 300 Millionen Jahren) muss das *CHS*-Gen dupliziert worden sein (Abb. 12). Eine Kopie codierte weiterhin die *CHS* und wurde funktionell bis heute durch negative Selektion konserviert. Die zweite Kopie war frei für neue Aufgaben und repräsentiert die vielen rezenten Polyketidsynthasen aus der Gruppe der *NCHS*.



duplikationen und wenige nicht-synonyme Mutationen reichen aus, um phänotypische Vielfalt zu erzeugen. Voraussetzung ist jedoch immer, dass der jeweilige Phänotyp für die Population so vorteilhaft ist, dass er sich unter Selektion durchsetzen kann und bewahrt wird.

6.2. Verwendung der Duplikate eines alten Gens für neue Aufgaben

Das Enzym Tryptophan-Synthase katalysiert den letzten Schritt in der Biosynthese der essentiellen Aminosäure Tryptophan. Das Enzym hat wegen seiner unentbehrlichen Funktion Milliarden Jahre Evolution von den Bakterien bis zu den Pflanzen nahezu unverändert überstanden. Das Enzym besteht aus zwei Untereinheiten, die durch verschiedene Gene codiert werden (Abb. 13). Die α -Untereinheit spaltet ihr Substrat Indol-3-glycerinphosphat (IGP) zu Indol und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP). Indol wird an die β -Untereinheit weitergereicht, die es mit der Aminosäure Serin zu Tryptophan verknüpft (Abb. 13).

Im Mais und einigen anderen Gräsern ist das Gen, das die α -Untereinheit der Tryptophan-Synthase codiert, zweimal unabhängig voneinander dupliziert worden. Die Kopien der α -Untereinheit haben die Fähigkeit verloren, sich mit der β -Untereinheit zur kompletten Tryptophan-Synthase zusammenzulagern. Sie katalysieren stattdessen die Spaltung von IGP zu GAP und freiem Indol. Sie werden im Mais als *IGL* (Indolglycerolphosphat-Lyase) und *BX1* bezeichnet (Abb. 13). *IGL* und *BX1* wurden im Zuge der Evolution zur Bereitstellung von Indol für verschiedenartige und neue Aufgaben rekrutiert.

6.2.1. *IGL* produziert Indol als Lockstoff in der indirekten Abwehr

Viele Pflanzen setzen bei Verletzung durch herbivore Insekten flüchtige Stoffe frei, die von Feinden der Herbivoren erkannt werden und sie zu ihrer Beute leiten. Bei Verletzung von Maisblättern durch herbivore Raupen wird durch das Enzym *IGL* Indol gebildet und als flüchtige Substanz freigesetzt. Indol lockt zusammen mit anderen Duftstoffen parasitische Wespen an, die ihre Eier in die Raupen legen (Frey et al 2000). Dies ist das Todesurteil für die Raupen, die zum lebenden Futter für die sich entwickelnden Larven der parasitischen Wespe werden. Indirekt ist damit auch dem Mais geholfen, frei nach dem Motto: Die Feinde meiner Feinde sind meine Freunde. Man bezeichnet dieses Phänomen deshalb auch als „indirekte Abwehr der Pflanze“.

Das *IGL*-Gen wurde im Zuge der Evolution von Abwehrmechanismen der Pflanze rekrutiert und unter die Regie eines regulatorischen Segments gestellt, das nur bei Verletzung der Blätter angeschaltet wird und damit durch Synthese der *IGL* auch die Bildung und Freisetzung von flüchtigem Indol als Wehrsignal in Gang setzt.

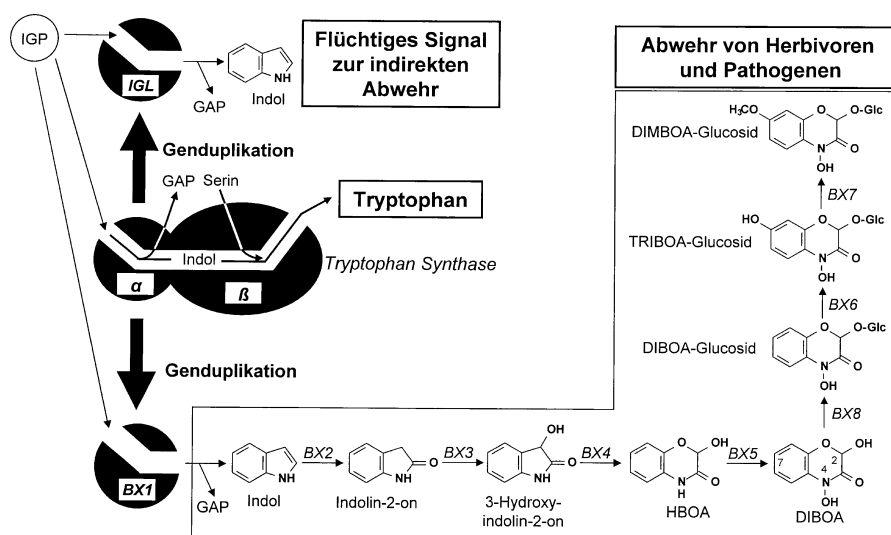


Abb. 13. Das Enzym Tryptophan-Synthase besteht aus zwei Untereinheiten (α und β). Es katalysiert die Bildung von Tryptophan aus Indol-3-glycerinphosphat (IGP) und Serin. Als Zwischenprodukt entsteht durch Katalyse der α -Untereinheit Indol. Im Mais wurden Genduplikate der α -Untereinheit zur Bereitstellung von Indol für zwei verschiedene Prozesse rekrutiert: *IGL* (Indol-3-glycerinphosphat-Lyase) zur Freisetzung von Indol als Wundsignal und *BX1* zur Bildung von Indol als Baustein für die Biosynthese der Benzoxazinoide. Biosynthese der Benzoxazinoide: Indol wird schrittweise durch vier Cytochrom-P450-Enzyme (*BX2* bis *BX5*) zu DIBOA (2,4-Dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-on) oxidiert. DIBOA wird durch das Enzym *BX8* glucosyliert und schließlich durch die Enzyme *BX6* und *BX7* hydroxyliert und O-methyliert. GAP = Glycerinaldehyd-3-phosphat.

6.2.1. *BX1* liefert Indol zur Synthese toxischer Abwehrstoffe (Benzoxazinoide)

Benzoxazinoide wie DIMBOA (Abb. 13) gehören zu einer kleinen Gruppe giftiger Alkaloide, die vor allem in Keimlingen von Mais zur Abwehr pathogener Mikroorganismen und herbivorer Insekten dienen. Sie werden in der Pflanze, gebunden an Zucker (DIMBOA-Glucosid), in ungiftiger Form gespeichert. Erst bei Verwundung entsteht durch Abspaltung von Glucose das giftige freie Alkaloid. Die Biosynthese der Benzoxazinoide beginnt mit der Bildung von Indol durch *BX1*. Indol wird dann schrittweise durch Einführung von Sauerstoff in DIBOA überführt. Die Reaktionen werden durch vier Cytochrom-P450-abhängige Enzyme (*BX2-BX5*) katalysiert. Die vier Enzyme haben sehr ähnliche Aminosäuresequenzen und ihre Gene sind nebeneinander auf einem Chromosom lokalisiert. Anordnung und Genstruktur beweisen, dass die vier Gene durch Tandem-Duplikation (Abb. 6) entstanden sein müssen. Ihre spezifischen Funk-

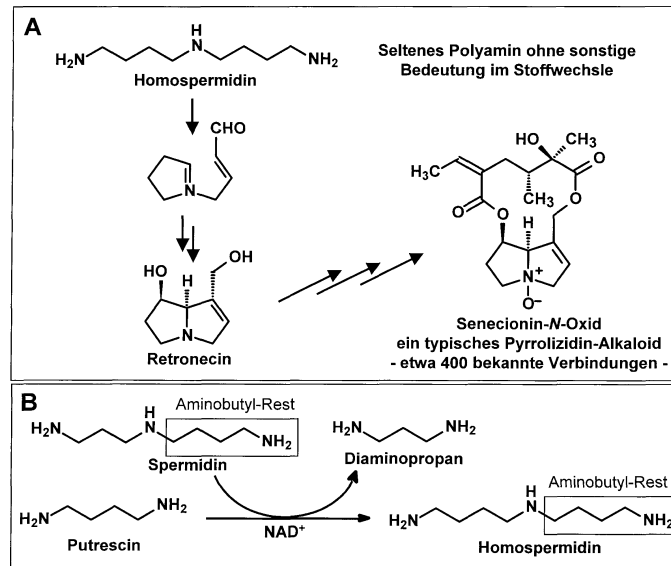


Abb. 14. Bildung der sporadisch im Pflanzreich vorkommenden Pyrrolizidin-Alkaloide (PAs). A: Homospermidin ist der gemeinsame Grundbaustein aller PAs. B: Reaktion der Homospermidin-Synthase (HSS), die nur in PA-führenden Pflanzen nachzuweisen ist. Das Enzym überträgt den Aminobutylrest des Spermidins auf Putrescin unter Bildung von Homospermidin und Diaminopropan.

tionen in der Biosynthese von DIBOA lassen sich durch Subneofunktionalisierung erklären.

6.3. Pyrrolizidin-Alkaloide: Rekrutierung eines alten Enzyms für eine neue Aufgabe

Pyrrolizidin-Alkaloide (PAs) repräsentieren eine Gruppe giftiger pflanzlicher Abwehrstoffe (Hartmann and Witte 1995). Sie entstehen aus Homospermidin, einem seltenen Baustein, der sonst im Stoffwechsel der Pflanzen keine Rolle spielt (Abb. 14A). Homospermidin wird durch das Enzym Homospermidin-Synthase (HSS) gebildet, das einen Aminobutylrest von Spermidin auf Putrescin überträgt (Abb. 14B). Das Enzym kommt nur in Pflanzen vor, die PAs bilden.

In allen höheren Organismen (Eukaryoten) kommt ein Protein vor, das in noch weitgehend unverständlicher Weise wichtige Funktionen des Zellwachstums reguliert. Dieser *eukaryotische Initiationsfaktor 5A* (*eIF5A*) wird durch ein Enzym aktiviert, das analog zur HSS-Reaktion einen Aminobutylrest des Spermidins auf einen Lysinrest des eIF5A-Proteins überträgt. Aus Lysin wird

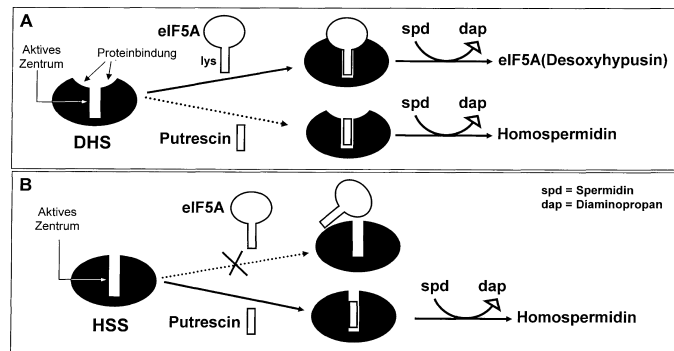


Abb. 15. Homospermidin-Synthase (HSS) ist durch Genduplikation des essentiellen Enzyms Desoxyhypusin-Synthase (DHS) entstanden, das den eukariotischen Initiationsfaktor 5A (eIF5A) aktiviert. A: Reaktion der DHS, das Enzym überträgt analog zur HSS-Reaktion den Aminobutylrest des Spermidins auf einen Lysin-Rest (lys) des eIF5A-Proteins. Als promiskuitives Substrat setzt die DHS auch Putrescin zu Homospermidin um. B: Die HSS ist eine DHS, die die Fähigkeit zur Bindung des eIF5A-Proteins verloren hat und Putrescin als Hauptsubstrat verwendet.

damit Desoxyhypusin (Abb. 15A). Das Enzym heißt Desoxyhypusin-Synthase (*DHS*). Molekularbiologische Untersuchungen deckten auf, dass die HSS in PA-führenden Pflanzen durch Genduplikation aus der *DHS* entstanden ist (Ober und Hartmann 1999). Beide Enzyme haben fast identische Eigenschaften, mit dem einzigen markanten Unterschied, dass die *HSS* die Fähigkeit zur Bindung des eIF5A-Proteins verloren hat (Abb. 15B). Andererseits setzt die *DHS* Putrescin mit der gleichen Aktivität zu Homospermidin um wie die *HSS*, nur spielt diese Aktivität bei der *DHS in situ* keine Rolle (Ober et al 2003).

Die Evolution der *HSS* aus der *DHS* erfordert aus mechanistischer Sicht nur wenige Verlustmutationen, die bewirken, dass die *DHS* ihre Fähigkeit verliert, den eIF5A zu binden. Das promiskuitive DHS Substrat Putrescin wird ohne erkennbare weitere Optimierung zum Hauptsubstrat der HSS (Abb. 15) (Ober et al 2003). Die eigentliche Evolution der HSS betrifft die Definition ihres regulatorischen Umfeldes. Während die DHS in allen Organen der Pflanze aktiv ist, findet man HSS-Aktivität nur in den Organen, in den PAs gebildet werden (Reimann et al 2004). Wir hatten dies früher als regulatorische Subfunktionalisierung definiert (Kap. 4.4.; Abb. 8). Hinzu kommt, dass die HSS integrierter Bestandteil der komplexen Biosynthese der Pyrrolizidin-Alkaloide ist, die in ihrer weiteren Reaktionsfolge molekular noch weitgehend unerforscht ist.

Für sich genommen verbirgt sich hinter der molekulare Evolution der HSS ein relativ einfacher Vorgang: Das Gen eines ubiquitären Phänotyps (Zellregulation) wird zufällig dupliziert und die Kopie kaum verändert für einen völlig anderen

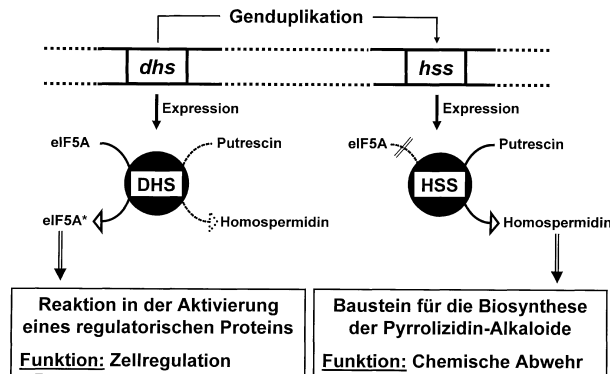


Abb. 16. Das Genduplikat der DHS wird nahezu unverändert rekrutiert und als HSS in ein neues Funktionsfeld (Biosynthese der Pyrrolizidin-Alkaloide) integriert.

Phänotyp (Chemische Abwehr) rekrutiert (Abb. 16). Ein Evolutionsbiologe würde in der Rekrutierung der HSS und ihrer Integration in die PA-Biosynthese ein seltenes und vermutlich einmaliges Ereignis sehen. Tatsächlich scheint das Phänomen aber keineswegs so selten und unwahrscheinlichen zu sein. Die phylogenetische Analyse zeigt, dass Genduplikation und Rekrutierung der HSS für die PA-Biosynthese mehrfach unabhängig voneinander innerhalb verschiedener Verwandtschaftslinien mit PA-führenden Arten entstanden sein muss (Abb. 17) (Reimann et al 2004).

7. Resümee und Ausblick

Evolution schafft Neues nicht durch beliebiges Probieren, sondern stets durch Veränderung eines existierenden Phänotyps. Richtung und Geschwindigkeit der Veränderung wird durch die Selektion bestimmt. Voraussetzung für die Evolution neuer Merkmale ist die hohe Stabilität der DNA, die durch die Sorgfalt ihrer Synthese und die ständige Reparatur spontaner Schäden gesichert wird. Alle dennoch auftretenden Veränderungen im Genom sind die Grundlage für Evolution. Für den Erhalt bewährter Phänotypen, oft über Jahrmilliarden hinweg, sorgt die negative (*purifying*) Selektion, die nachteilig veränderte Phänotypen ausmerzt und damit gleichzeitig alle dafür verantwortlichen Veränderungen und Schäden im Genom beseitigt. Vorteilhaft veränderte Phänotypen werden durch positive Selektion in der Population angereichert und bewahrt.

Lange Zeit sah man in Genmutationen, die einen Phänotyp vorteilhaft verändern, die wichtigste Voraussetzung für positive Selektion. Dieses Bild hat sich

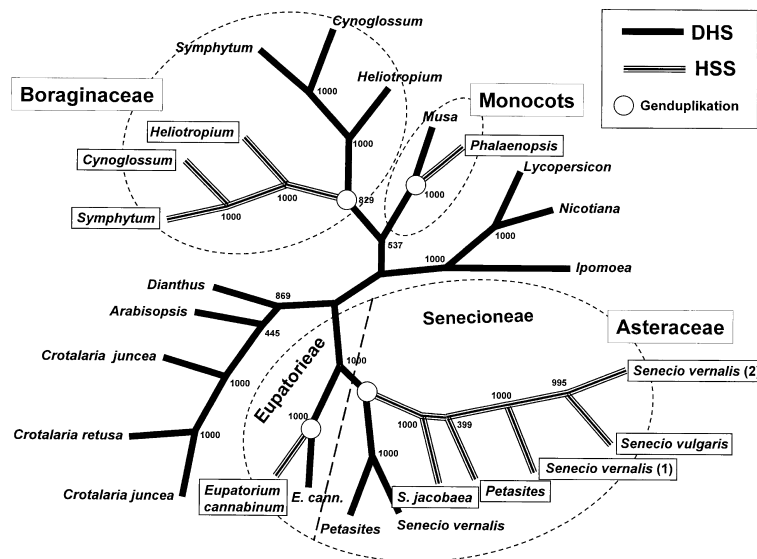


Abb. 17. Molekularer Ähnlichkeitsbaum von HSS und DHS einiger PA-führender Pflanzen. Der Baum basiert auf der Ähnlichkeit der jeweiligen Gen- und Protein-Sequenzen. Der Baum zeigt, dass die Duplikation des DHS-Gens im Verlaufe der Angiospermen-Evolution in den untersuchten Taxa viermal unabhängig erfolgt sein muss. Beweis: Innerhalb der untersuchten Taxa haben HSS und DHS eine größere Sequenzhomologie zueinander als die HSS-Sequenzen verschiedener Taxa untereinander. Verändert nach Reimann et al (2004).

in den letzten Jahren erheblich erweitert. Seit bekannt ist, dass im Verlauf der Evolution der Organismen der gesamte Genbestand des Genoms zahlenmäßig verändert und räumlich neu arrangiert werden kann, kommen weitere Mechanismen ins Spiel. Durch die Verdopplung von Genen werden Kopien essentieller Gene für die Evolution neuer Funktionen freigestellt. Durch Neuorganisation des Genoms und seiner Chromosomenstruktur werden Gene räumlich neu verteilt und zugeordnet und können damit unter die Regie neuer Kontrollfunktionen geraten. Alle diese Veränderungen sind, soweit wir dies heute wissen, zufallsbedingt und werden durch Selektion eliminiert oder bewahrt.

Die Verdopplung eines lebensnotwendigen Merkmals durch Genduplikation entlässt eine Kopie aus den Zwängen der negativen Selektion. Sie steht der Evolution als „Spielwiese“ für die Entwicklung eines neuen Merkmals zur Verfügung. Die Beispiele aus Kap. 6 machen dies deutlich:

- Promiskuitive Polyketidsynthasen können durch wenige Punktmutationen unter dem Einfluss positiver Selektion in ihrer Substrat- und Produktspezifität vielfältig variiert werden.

- Indol, seit Jahrmilliarden Baustein der Aminosäure Tryptophan, übernimmt in einigen Gräsern völlig neue Aufgaben in der chemischen Abwehr – als flüchtiges Signal oder als Alkaloid-Baustein. Voraussetzung ist die Freistellung des Indol-bildenden Enzyms durch Genduplikation.
- Das Duplikat eines essentiellen Enzyms (Desoxyhypusin-Synthase) kann mit seiner promiskuitiven Aktivität (Homospermidin-Synthase) für eine völlig andere Aufgabe rekrutiert werden.

Eine Erkenntnis aus den drei Beispielen ist, dass es für die Evolution gleichgültig zu sein scheint, aus welchem funktionellen Zusammenhang ein dupliziertes Gen stammt. Es wird, wie aus einem Baukasten, der Stein ausgewählt, der am besten passt. Der Zellbiologe und Genetiker François Jacob, einer der Väter der Molekularbiologie, umschreibt in seinem auch heute noch aktuellen Artikel Evolution als „Basteln und Ausprobieren“ (*evolution as tinkering*) (Jacob 1977). Die Analogie des Bastlers wird noch überzeugender, wenn wir uns klar machen, dass nicht nur ein Baustein (z.B. Indol oder Homospermidin), sondern eine ganze Reihe passender Bausteine benötigt werden, um zum Beispiel eine Biosynthesefolge zu vervollständigen. Ein für das „Zusammenbasteln“ von Biosynthesewegen verantwortlicher evolutionärer Mechanismus könnte in der kontinuierlichen Neuordnung der Genome liegen. Wir haben die hohe Dynamik (betrachtet in evolutionären Zeitdimensionen) dieses Vorganges am Beispiel der Evolution des Genoms von *Arabidopsis thaliana* in Kap. 3.2.1. besprochen (Henry et al, 2006). Bei der genomischen Neuordnung können Strukturgene in neue Nachbarschaften und unter die Kontrolle neuer regulatorischer Elemente geraten. Die dabei entstehenden neuen oder variierten Phänotypen haben sich stets auf dem Prüfstand der Selektion zu bewähren. Eine wesentliche „Strategie“ der Evolution scheint darin zu bestehen, Neues und Neuheiten durch Veränderung, Rekrutierung und Neuordnung bestehender Merkmale (Funktionen) zu schaffen. Künftige Forschung wird die vielfach noch spekulativen Vorstellungen konkret weiterzuentwickeln haben. Der pflanzliche Sekundärstoffwechsel wird dabei auch weiterhin wichtige Beispiele und Modelle bereitstellen.

Literatur

ABE, I. & H. MORITA (2010): Structure and function of the chalcone synthases superfamily of plant type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* **27**: 809–838.

ADAMS, K.L. & J.F. WENDEL (2005): Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 135–141.

AUSTIN, M.B. & J.P. NOEL (2003): The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* **20**: 79–110.

- BEERHUES, L. & B. LIU (1909): Biosynthesis of biphenyls and benzophenones – evolution of benzoic acid-specific type III polyketide synthases in plants. *Phytochemistry* **70**: 1719–1727.
- DARWIN, C. (1859): *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. 502 pp, John Murray, London.
- DEPRISTO, M.A. (2007): The subtle benefits of being promiscuous: adaptive evolution potentiated by enzyme promiscuity. *HFSP Journal* **1**: 94–98.
- CARROLL, S.B. (2006): *Endless forms most beautiful – the new science of evo devo and making the animal kingdom*. 368 pp, London: Weidenfeld & Nicolson.
- DADAY, H. (1954a): Gene frequencies in wild populations of *Trifolium repens* – I. distribution by latitude. *Heredity* **8**: 61–78.
- DADAY, H. (1954b): Gene frequencies in wild populations of *Trifolium repens* – II. distribution by altitude. *Heredity* **8**: 377–384.
- DESALLE, R. & I. TATTERSALL (2008): *Human origins: what bones and genomes tell us about ourselves*. 240 pp, Texas A & M University Press.
- FORCE, A., M. LYNCH, F.B. PICKETT, A. AMORES, Y.-I. YAN & J. POSTLETHWAIT (1999): Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **151**: 1531–1545.
- FREY, M., C. STETTNER, P.W. PARE, E.A. SCHMELZ, J.H. TUMLINSON & A. GIERL (2000): An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 14801–14806.
- HARTMANN, T. (1996): Diversity and variability of plant secondary metabolism: A mechanistic view. *Entomol. Exp. Appl.* **80**: 177–188.
- HARTMANN, T. (2007): From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **68**: 2831–2846.
- HARTMANN, T. & L. WITTE (1995): Chemistry, biology and chemical ecology of the pyrrolizidine alkaloids. In: PELLETIER, S.W. (ed) *Alkaloids: chemical and biological perspectives*, vol 9. Pergamon Press, Oxford, pp 155–233.
- HE, X. & J. ZHANG (2005): Rapid subfunctionalization accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution. *Genetics* **169**: 1157–1164.
- HENRY, Y., M. BEDHOMME & G. BLANC (2006): History, protohistory and prehistory of the *Arabidopsis thaliana* chromosome complement. *Trends Plant Sci.* **11**: 267–273.
- HESIN-BRUMSSTEIN, Y., D. LANCET & T. OLENDER (2009): Human olfaction: from genomic variation to phenotypic diversity. *Trends Genet.* **25**: 178–184.
- JACOB, F. (1977): Evolution and tinkering. *Science* **196**: 1161–1166.

- JONES, D. (1972): Cyanogenic glycosides and their function. In: *Phytochemical ecology* (ed. Harborne, J.B.) 103–124. London, New York: Academic Press.
- KHERSONSKY, O., C. ROODVELDT & D.S. TAWFIK (2006): Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**: 498–508.
- LYNCH, M. & J.S. CONERY (2003): The evolutionary demography of duplicate genes. *J. Struct. Funct. Genomics* **3**: 35–44.
- MOORE, R.C. & PURUGGANAN (2005): The evolutionary dynamics of plant duplicate genes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 122–128.
- NACHMANN, M.W. & S.L. CROWELL (2000): Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. *Genetics* **156**: 297–304.
- OBER, D. (2005): Seeing double: gene duplication and diversification in plant secondary metabolism. *Trends Plant Sci.* **10**: 444–449.
- OBER, D. (2010): Gene duplication and the time thereafter – examples from plant secondary metabolism. *Plant Biol.* **12**: 570–577.
- OBER, D. & T. HARTMANN (1999): Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 14777–14782.
- OBER, D., R. HARMS, L. WITTE & T. HARTMANN (2003): Molecular evolution by change of function: Alkaloid-specific homospermidine synthase retained all properties of deoxy-hypusine synthase except binding the eIF5A precursor protein. *J. Biol. Chem.* **278**: 12805–12812.
- OHNO, S. (1970): *Evolution by gene duplication*. 160 pp, New York: Springer-Verlag.
- PEER, W.A. & A.S. MURPHY (2007): Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators. *Trends Plant Sci.* **12**: 556–563.
- PICHERSKY, E. & D.R. GANG (2000): Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: An evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.* **5**: 439–445.
- REIMANN, A., N. NURHAYATI, A. BACKENKÖHLER & D. OBER (2004): Repeated evolution of the pyrrolizidine alkaloid-mediated defense system in separate angiosperm lineages. *Plant Cell* **16**: 2772–2784.
- RIDLEY, M. (2004): *Evolution*, 3rd Edition, 751 pp. Malden-Oxford-Carlton: Blackwell Publishing.
- ROTH, C., S. RASTOGI, L. ARVESTAD, K. DITTMAR, S. LIGHT, D. EKMAN & D.A. LIRBERLES (2007): Evolution after gene duplication: models, mechanisms, sequences, systems and organisms. *J. Exp. Zool. Part B. Molecular and developmental evolution* **308**: 58–73.